

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April hingga Oktober 2020. Penelitian pengujian kadar antosianin, pH, antioksidan, vitamin C dan organoleptik dilakukan di Laboratorium Analisa Pangan Kampus III Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kombucha adalah kompor, panci, sendok, pengaduk, saringan, timbangan analog (merk *Salter*), thermometer, serbet, karet gelang, stoples kaca transparan dan gelas ukur.

Alat-alat yang digunakan dalam pengujian karakteristik fisikokimia adalah timbangan analitik, gelas arloji, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 500 ml, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 250 ml, erlenmeyer 100 ml, corong glass, hot plate, botol reagen coklat 250 ml, batang pengaduk, gelas beaker 100 ml, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 100 ml, aluminium foil, pipet tetes, pipet volume 25 ml, propipet, pH meter (merk *Schott*) dan spektrofotometer UV-Vis (merk *Shimadzu*).

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan yang digunakan untuk pembuatan kombucha dan pengujian karakteristik fisikokimia kombucha. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kombucha adalah teh bunga rosella yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat yang dipanen saat biji telah tua (umur 3-4 minggu) yang ditandai dengan kulit biji pembungkus majemuk yang berwarna coklat dan sedikit terbuka atau membelah,

starter cair kombucha dan bakteri SCOBY berumur >14 hari yang didapatkan dari Indokombucha Bogor, air bersih, gula pasir, serta kertas label. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis antara lain larutan amilum 1%, aquades, serbuk DPPH, etanol 96%, methanol, KCl, Na-Asetat, HCl, iodin, amilum.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang disusun secara faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu faktor pertama adalah konsentrasi bakteri SCOBY yang terdiri dari 3 level dan faktor kedua yaitu perbedaan lama waktu fermentasi yang terdiri dari 4 level. Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali ulangan sehingga jumlah total sampel sebanyak 24 sampel. Berdasarkan rancangan tersebut maka dapat dibuat analisis variansi ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mendapatkan kesimpulan mengenai pengaruh perlakuan. Secara lebih detail kombinasi keduanya dapat dilihat sebagai berikut:

Faktor I adalah perbedaan konsentrasi bakteri SCOBY:

- S1 : 5%
- S2 : 10%
- S3 : 15%

Faktor II adalah perbedaan lama waktu fermentasi:

- R1 : 6 hari
- R2 : 7 hari
- R3 : 8 hari
- R4 : 9 hari

Tabel 4. Desain Eksperimen

S(%) R(%)	R1	R2	R3	R4
S1	S1R1	S1R2	S1R3	S1R4
S2	S2R1	S2R2	S2R3	S2R4
S3	S3R1	S3R2	S3R3	S3R4

Keterangan:

S1R1 = 5% bakteri SCOBY + 6 hari lama waktu fermentasi

S1R2 = 5% bakteri SCOBY + 7 hari lama waktu fermentasi

S1R3 = 5% bakteri SCOBY + 8 hari lama waktu fermentasi

S1R4 = 5% bakteri SCOBY + 9 hari lama waktu fermentasi

S2R1 = 10% bakteri SCOBY + 6 hari lama waktu fermentasi

S2R2 = 10% bakteri SCOBY + 7 hari lama waktu fermentasi

S2R3 = 10% bakteri SCOBY + 8 hari lama waktu fermentasi

S2R4 = 10% bakteri SCOBY + 9 hari lama waktu fermentasi

S3R1 = 15% bakteri SCOBY + 6 hari lama waktu fermentasi

S3R2 = 15% bakteri SCOBY + 7 hari lama waktu fermentasi

S3R3 = 15% bakteri SCOBY + 8 hari lama waktu fermentasi

S3R4 = 15% bakteri SCOBY + 9 hari lama waktu fermentasi

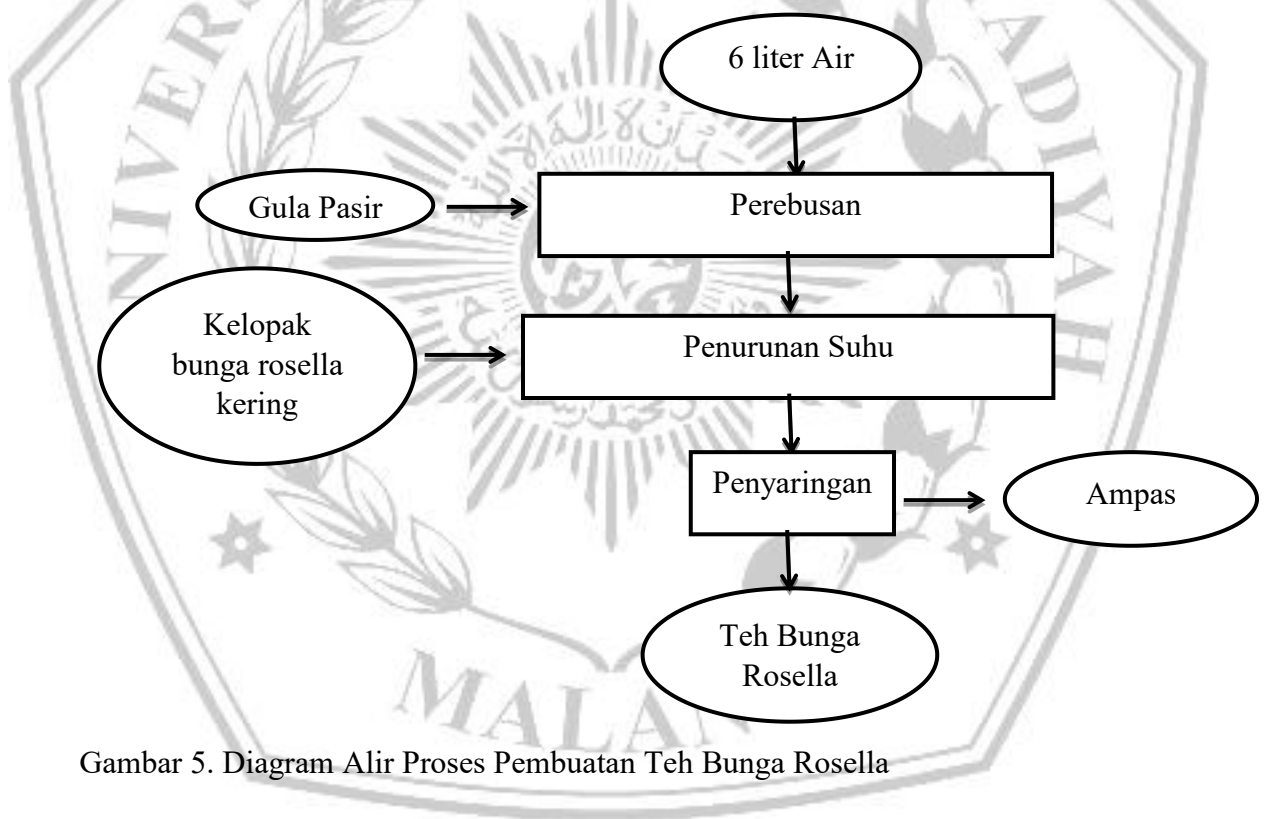
Diperoleh 12 perlakuan, dengan 2 kali ulangan. Pada bab pembahasan akan dibandingkan secara deskriptif dengan kontrol yaitu produk pasar teh kombucha.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Tahap pelaksanaan terdiri dari pembuatan teh bunga rosella, dan pembuatan kombucha bunga rosella.

a. Pembuatan Teh Bunga Rosella (Sugiarto,2011)

Kelopak bunga rosella kering yang akan digunakan disortasi terlebih dahulu. Kemudian disiapkan air sebanyak 6L dan direbus hingga mendidih. Setelah mendidih, ditambahkan gula pasir sebanyak 660 gram. Selanjutnya, suhu diturunkan hingga mencapai 60°C. Kelopak bunga rosella kering dicampurkan, diamkan selama 15 menit. Kemudian kelopak rosella dengan air teh dipisahkan dengan cara disaring dan dibuang ampasnya. Berikut diagram alir proses pembuatan teh bunga rosella:

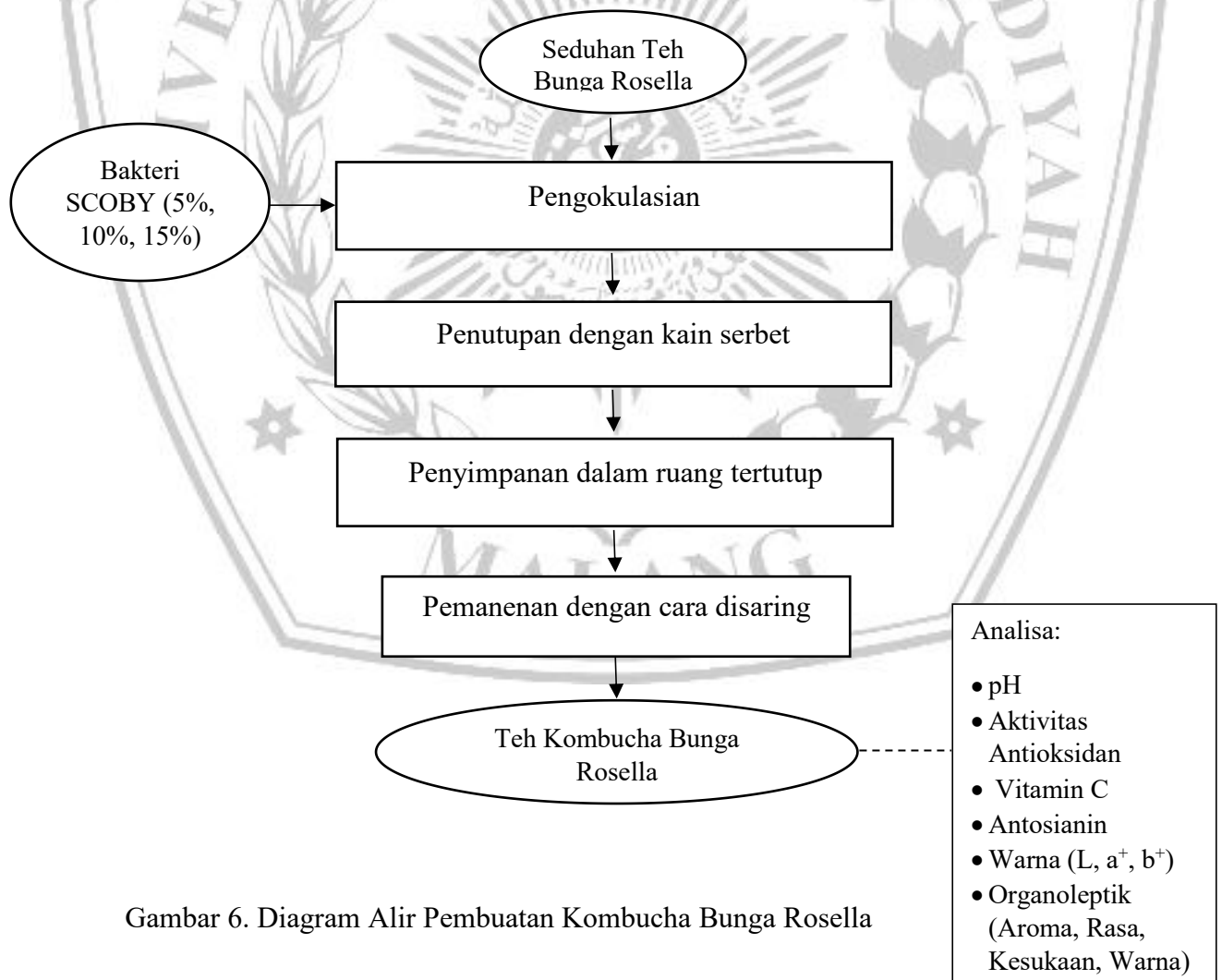


Gambar 5. Diagram Alir Proses Pembuatan Teh Bunga Rosella

b. Pembuatan Kombucha Teh Bunga Rosella (Indokombucha, ,2013)

Seduhan teh bunga rosella dimasukkan ke dalam 12 stoples kaca sebanyak 500` ml setiap stoples kaca. Seduhan teh bunga rosella ditunggu sampai temperatur sama dengan suhu ruang atau 25°C. Selanjutnya kultur cair kombucha

ditambahkan untuk setiap stoples kaca dan ditambah juga SCOBY dengan berat sesuai dengan perlakuan (5%, 10%, 15%) ke dalam setiap stoples kaca yang telah terisi teh bunga rosella. Kemudian, stoples kaca ditutup menggunakan serbet kemudian diikat menggunakan karet gelang dan disimpan di dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari. Teh bunga rosella difermentasi sesuai dengan perlakuan yaitu 6 hari, 7 hari, 8 hari, 9 hari sampai masa panen. Selama masa fermentasi, stoples tidak boleh terkena guncangan. Setelah proses fermentasi, kombucha dipisahkan dengan bakteri SCOBY dengan cara disaring dan dimasukkan ke dalam botol. Kemudian dilakukan analisa. Berikut diagram alir pembuatan kombucha bunga rosella:



Gambar 6. Diagram Alir Pembuatan Kombucha Bunga Rosella

3.5 Parameter Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu analisis fisikokimia meliputi pH, Aktivitas Antioksidan, Vitamin C, Antosianin, Warna (L , a^+ , b^+) dan Analisa Organoleptik yang meliputi Aroma, Rasa, Kesukaan, Warna.

3.5.1 Analisa pH (Badan Standarisasi Nasional, 2004)

- a. Alat pH disiapkan dan nyalakan
- b. Elektroda pH dibersihkan menggunakan aquades dan dikeringkan dengan menggunakan tisu
- c. Elektroda pH dicelupkan pada larutan buffer untuk dikalibrasi
- d. Elektroda dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu lalu gunakan elektroda untuk mengukur sampel yang akan diuji

3.5.2 Uji Antioksidan Metode DPPH (Yue dan Xu, 2008)

Prinsip dari metode DPPH adalah senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidroennya pada radikal DPPH, sehingga menyebabkan DPPH menjadi bentuk tereduksi yang bersifat nonradikal, yang dilihat dari absorbansi 517 nm menggunakan spektrofotometer. Adapun analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebagai berikut:

1. Pembuatan Larutan DPPH

- a. Serbuk DPPH dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{Mr} \times \text{Vol (L)}}$$

- b. Serbuk DPPH dilarutkan dengan methanol 96% pada labu ukur hingga batas tera, dan dihomogenkan.

- c. Larutan DPPH disimpan pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada kondisi dingin, serta sesegera mungkin digunakan.
- d. DPPH diambil 1 ml dan ditambahkan etanol 96% dan dihomogenkan.
- e. Blanko disimpan dalam kondisi gelap pada kondisi dingin selama 30 menit.
- f. Absorbansi blanko dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm.

2. Ekstrak Bahan Aktif

- a. Sampel ditimbang sebanyak ± 1 gram ke dalam tube sentrifuse.
- b. Sampel ditambahkan larutan etanol 96% sebanyak 9 mL.
- c. Sampel disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
- d. Supernatan dipisahkan untuk uji aktivitas antioksidan

3. Analisa Aktivitas Antioksidan

- a. Supernatan diambil sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi.
- b. Sampel ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan menghomogenkannya.
- c. Mulut tabung reaksi ditutup dengan *plastic wrap*, dan badan tabung dengan dengan alumunium foil.
- d. Sampel disimpan pada kondisi gelap selama 30 menit.
- e. Absorbansi sampel dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.
- f. Dihitung % inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{larutan sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

3.5.3 Uji Kadar Vitamin C (Almatsier, 2003)

- a. Sampel diambil sebanyak 0,6 gram
- b. Diencerkan dengan menggunakan 20 mL aquades

- c. Sampel yang sudah diencerkan kemudian disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat
- d. Filtrat diambil sebanyak 5 mL
- e. Filtrat ditetesi dengan amilum sebanyak 3 tetes
- f. Dititrasi dengan menggunakan iodin sampai berubah warna menjadi biru gelap
- g. Dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Vit. C (mg/100g)} = \frac{\text{Vol. Iodin} \times 0,88}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.5.4 Analisa Warna (*Colour Reader*) (Yuwono dan Susanto, 2001)

Adapun tahapan analisa intensitas warna menggunakan *colour reader* adalah sebagai berikut:

- a. Bahan diletakkan pada permukaan yang datar.
- b. Lensa pembaca warna diarahkan ke bahan.
- c. Tombol target ditekan untuk membaca warna.
- d. Hasil warna pada layar dilihat dan dicatat nilai intensitas warna (L, a, dan b)

3.5.5 Analisis Total Antosianin dengan Metode *pH Differential* (AOAC, 2005)

- **Pembuatan Larutan Buffer**

1. *Buffer* pH 1

Larutan KCl: 0,025 M KCl (0,186 g dalam 98 mL akuades). Untuk membuat *buffer* pH 1, sebanyak 980 mL larutan KCl 0,025 M ditambahkan dengan 0,63 mL HCl 37%.

2. *Buffer* pH 4,5

Larutan Na-asetat: 0,4 M larutan Na-asetat (5,443 g dalam 96 mL aquades).

Untuk membuat *buffer* pH 4,5 sebanyak 960 mL larutan Na-asetat 0,4 M ditambahkan dengan 2 mL HCl 37%.

• Penentuan Total Antosianin

1. Sampel dimasukkan dalam pelarut metanol asam dengan perbandingan (1:5) ke dalam *beaker glass*.
2. Larutan sampel dihomogenkan, dan seluruh bagian wadah ditutup dengan penutup gelap.
3. Sampel dimaserasi pada suhu -23°C selama 1 jam.
4. 1 mL sampel dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi.
5. Sampel pada tabung reaksi pertama ditambahkan larutan *buffer* pH 1 sebanyak 9 mL dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan *buffer* pH 4,5 sebanyak 9 mL.
6. Sampel dilakukan *scanning* dengan panjang gelombang rentang 520-700 nm pada larutan sampel pada kedua *buffer* untuk mengetahui panjang gelombang maksimal yang dimiliki oleh sampel pewarna.
7. Sampel dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 520 nm dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing contoh dan hasilnya dikalkulasikan berdasarkan persamaan berikut:

$$A = (A_{520} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1 - (A_{520} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4,5$$

$$\text{Total Antosianin (mg/L)} = \frac{[(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000)]}{(\epsilon) \times l}$$

Keterangan:

A = Absorbansi

MW = *Molecular Weight* (Berat Molekul sianidin glukosida = 449,2)

DF = *Dilution factor* (Faktor Pengenceran = 10 mL/ 1 mL)

ϵ = Absorptivitas molar/ koefisien ekstingsi molar (29.600 L cm⁻¹)
 l = Lebar kuvet (1 cm)

3.5.6 Uji Organoleptik (SNI 01-2346-2006)

Uji organoleptik yang dilakukan meliputi aroma, rasa, warna serta penerimaan keseluruhan oleh panelis. Pengujian dilakukan dengan memberikan sampel yang masing-masing telah terdapat kode yang berbeda kepada 20 panelis tidak terlatih. Kemudian panelis diminta memberikan penilaian terhadap sampel sesuai dengan skala hedonik yang tercantum.

Tabel 5. Skala Uji Organoleptik

Nilai	Rasa	Warna	Aroma	Kesukaan
1	Sangat tidak asam	Sangat tidak menarik	Sangat tidak sedap	Sangat tidak suka
2	Tidak asam	Tidak menarik	Tidak sedap	Tidak suka
3	Agak tidak asam	Agak tidak menarik	Agak tidak sedap	Agak tidak suka
4	Netral	Netral	Netral	Netral
5	Agak asam	Agak menarik	Agak sedap	Agak suka
6	Asam	Menarik	Sedap	Suka
7	Sangat Asam	Sangat menarik	Sangat sedap	Sangat suka